

Zur kolorimetrischen Albuminbestimmung im Serum

Von

Z. F. CH. KACHANI

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Kiel (Direktor: Prof. Dr. H. Gärtner)

(Der Schriftleitung zugegangen am 4. September 1963)

Es wird über eine einfache und schnell durchführbare Methode berichtet, bei der sich mittels der kolorimetrischen Bestimmung quantitative, reproduzierbare Werte für das Albumin im Serum ergeben. Die gemessene Fraktion besteht, wie sich immunoelektrophoretisch zeigen läßt, aus reinem Albumin. Vergleichsuntersuchungen bei 60 normalen und pathologischen Seren zeigten eine gute Übereinstimmung des neuen Verfahrens mit den Ergebnissen der Elektrophorese.

A simple, rapid method is reported for the quantitative, colorimetric determination of serum albumin. The values are reproducible. The measured fraction consists of pure albumin, as shown by immunoelectrophoresis. Comparison of results for 60 normal and pathological sera showed good agreement between the new method and electrophoresis.

Zur quantitativen Fraktionierung der Serumeiweißkörper hat das Fällungsverfahren mit organischen Lösungsmitteln wegen der uneinheitlichen Fraktionen im klinisch-chemischen Laboratorium kaum Eingang gefunden, und auch die Trennung mittels der Ultrazentrifuge ist aus praktischen Gründen für die Routineuntersuchung nicht durchführbar. Durchgesetzt haben sich in der Klinik am meisten die *Aussalzmethoden* und die *Elektrophorese*. — Die Aussalzverfahren sind zeitraubend. Auch entstehen dabei keine elektrophoretisch reinen Albuminfraktionen, wie wir bei unseren Vergleichsuntersuchungen in Übereinstimmung mit PILLEMER und Mitarbeitern (1) feststellen konnten. Bei der Verwendung von Natriumsulfat als Fällungsmittel war außerdem das Verhältnis Albumin zu Globuline nicht demjenigen der Elektrophorese vergleichbar. So hat sich die Elektrophorese trotz des apparativen Aufwandes in den vergangenen 15 Jahren weit verbreitet.

Es schien uns deshalb wichtig, eine Methode zu entwickeln, die es mit wenig Zeit- und Kostenaufwand und ohne spezielle Apparaturen ermöglicht, Serumeiweißkörper quantitativ zu fraktionieren, so daß die Ergebnisse mit denjenigen der Elektrophorese vergleichbar sind. — Hierbei gingen wir von einer Mitteilung von LAVINE (2) sowie DELAVILLE und Mitarbeitern (3) aus, die zuerst beobachten konnten, daß das mit Trichloressigsäure („TES“) präzipitierte Rinder- bzw. Serumalbumin durch Zusatz von polaren Lösungsmitteln löslich wird. Die Feststellung, daß durch TES gefällte Albumine bei Zugabe von Aceton und Alkohol wieder löslich werden, ist von SCHWERT (4), KORNER und Mitarbeiter (5) zur Herstellung von biologisch einwandfreien, hochgereinigten Albuminen benutzt, und von verschiedenen Seiten (6, 7) als Methode der Wahl zur Albumingewinnung mit großer Ausbeute empfohlen worden, weil durch die TES-Äthanol-Behandlung das Albumin seine physikalisch-chemischen Eigenschaften nicht verändert. Elektrophoretische Be-

weglichkeit, Farbstoffbindungsvermögen, Sedimentationskonstante, Löslichkeit, Kristallisierbarkeit und immunologische Eigenschaften bleiben nachweislich dieselben, wie diejenigen der unbehandelten Albumine (5, 8, 9).

Es war zu prüfen, ob eine kolorimetrische Albuminbestimmung nach TES-Äthanol-Behandlung möglich ist und diese quantitative, reproduzierbare Werte erbringt. Dabei mußten wir zunächst feststellen, daß das von SCHWERT (4) und anderen Autoren benutzte Extraktionsverfahren sich für die kolorimetrischen Bestimmungen wegen der Trübung, die nach Zusatz des Biuretreagenzes entstand, nicht eignet. Nach weiteren Versuchen gelang es uns schließlich, folgende Methodik zu entwickeln.

Methodik

Zu 4,8 ml TES-Äthanol-Lösung (0,4 g Trichloressigsäure in 100 ml 97-proz. Äthanol p. a.) 0,2 ml Serum ganz langsam und tropfenweise direkt oberhalb des Flüssigkeitsspiegels zugeben. Nicht schütteln! Nach 5 Min. das Präzipitat mit einem Glasstab gut in der Flüssigkeit verteilen. 5 Min. bei 5000 U/Min. zentrifugieren, Überstand dekantieren. In einem Reagenzglas 5 ml Biuretreagenz und 2,5 ml NaCl-NaOH-Lösung (0,1 g NaOH in 100 ml 1,8-proz. NaCl-Lösung) vorlegen. Erst jetzt mit 2,5 ml von dem klaren Überstand ganz langsam überschichten. Durch sehr schnelles Umkippen des Röhrchens (wichtig!) den Inhalt gut mischen. Die Flüssigkeit muß nach Entweichen der Gasbläschen völlig klar sein. Nach Ablauf von 30 Min. gegen den Leerwert, der aus 5 ml Biuretreagenz und 5 ml NaCl-Lösung besteht, ablesen, und zwar in derselben Art, wie es bei der Gesamteiweißbestimmung nach WEICHSELBAUM üblich ist (10). (Photometer Eppendorf, 20 mm Küvetten, Filter 546 m μ .)

Um festzustellen, ob zwischen dem auf diese Weise ermittelten Albumingehalt des Serums und der Farbintensität ein gesetzmäßiger Zusammenhang besteht, wurden 11 Eichlösungen zwischen 0,5 bis 5,0 g% mit humanem Serumalbumin¹⁾ in physiol. Kochsalzlösung hergestellt. Zur Kontrolle, ob die im Serum vorhandenen

¹⁾ Behringwerke.

Globuline das Ergebnis beeinflussen, wurde den Eichlösungen in einer Parallelserie außerdem normales Serum zugesetzt und hier nach Ablauf der Reaktionszeit gegen dasselbe Serum mit entsprechender Verdünnung, aber ohne Albuminzusatz, als Leerwert abgelesen. Der gradlinige Verlauf der Eichkurve, der sich aus beiden Serien ergab, zeigte, daß das *Lambert-Beersche* Gesetz zwischen 0,5 und 5,0 g% Albumine erfüllt ist; dieses bedeutet eine direkte Gesetzmäßigkeit zwischen der Extinktion und dem Albumingehalt des Serums. Auf Grund der Eichkurve wurde der Faktor 1,22²⁾ ausgerechnet, d. h.: Extinktion \times Faktor des Biuret nach WEICHSELBAUM³⁾ \times 1,22 = g% Albumin.

Um nachzuprüfen, ob die erzielten Eiweißwerte durch eine reine und einheitliche Albuminfraktion bedingt waren, wurden nach der Pervaporation und Dialyse mit den extrahierten Albuminen eine Immunelektrophorese und eine Papierelektrophorese angesetzt. Die Abbildungen 1 und 2 zeigen, daß in beiden Verfahren das extrahierte Eiweiß sich als eine reine Albumin-Fraktion darstellte.



Abb. 1

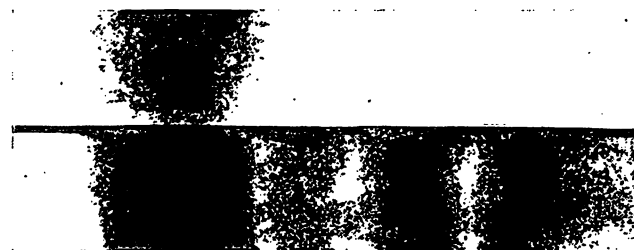


Abb. 2

Schließlich wurde durch Vergleichsuntersuchungen bei 60 normalen und pathologischen Seren geprüft, ob die Ergebnisse des TES-Äthanol-Verfahrens denjenigen der Elektrophorese ebenbürtig sind. Jede der beiden Methoden wurde in doppeltem Ansatz durchgeführt; die Mittelwerte wurden miteinander verglichen. Wie die Tabelle 1 zeigt, besteht eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der beiden Verfahren. Die Schwankungen liegen innerhalb der Fehlerbreite der beiden Methoden. Die Fehlerbreite von $\pm 0,05$ g% für das TES-Äthanol-Verfahren war weit geringer als diejenige der Elektrophorese. — Bei pathologischen Seren mit stark verminderten Albuminwerten fielen die Ergebnisse der TES-Äthanol-Methode durchschnittlich

²⁾ Dieser Faktor entspricht einer Ausbeute von 82%.

³⁾ Dieser Faktor muß für jedes neue Biuretreagens neu bestimmt werden, deshalb haben wir auf Angabe einer konstanten Zahl verzichtet.

Tab. 1

Lfd. Nr.	Gesamt-Eiweiß g %	Gefundene Albumingehalte			
		TES-Äthanol-Methode		Elektrophorese	
		g %	rel. %	g %	rel. %
1	6,293	3,62	57	3,52	56
2	6,15	3,7	60	3,69	60
3	6,15	3,2	52	3,26	53
4	5,996	3,5	58	3,54	59
5	6,10	3,55	58	3,54	58
6	5,637	3,45	61	3,44	61
7	5,945	3,375	56	3,21	54
8	6,211	3,5	57	3,66	59
9	6,15	3,55	59	3,63	59
10	6,45	3,62	56	3,74	58
11	5,84	3,75	64	3,74	64
12	6,04	3,62	60	3,62	60
13	6,15	3,125	53	3,44	56
14	6,047	3,8	63	3,81	63
15	6,76	3,75	56	3,92	58
16	6,04	3,35	56	3,44	57
17	6,15	4,125	67	4,12	67
18	6,04	3,75	62	3,68	61
19	6,662	4,375	65	4,40	66
20	3,28	2,125	64	2,07	63
21	6,498	4,125	63	4,16	64
22	6,46	4,07	63	4,01	62
23	5,945	3,67	60	3,39	57
24	5,47	3,62	66	3,56	65
25	6,25	3,125	50	3,25	52
26	6,56	4,125	62	4,07	62
27	6,355	4,525	71	4,45	70
28	5,424	3,425	63	3,42	63
29	6,622	3,425	52	3,51	53
30	6,7	3,5	52	3,69	55
31	5,53	3,625	65	3,65	66
32	6,15	3,43	55	3,38	55
33	5,54	3,25	58	3,05	55
34	6,4	4,175	65	4,10	64
35	6,6	3,875	58	3,83	58
36	6,7	3,8	56	3,75	56
37	6,15	4,0	65	4,00	65
38	5,59	3,25	58	3,53	56
39	6,4	3,5	54	3,58	56
40	5,2	2,7	52	2,7	52
41	6,8	4,7	69	4,7	69
42	7,1	4,7	66	4,6	65
43	7,0	3,3	47	3,3	48
44	6,2	4,25	68	4,2	68
45	6,0	3,5	58	3,48	58
46	7,1	3,12	44	3,2	46
47	6,66	3,87	58	3,89	58
48	6,86	3,9	57	3,85	56
49	6,1	2,37	39	2,6	43
50	8,14	2,58	32	2,68	33
51	7,76	4,06	52	4,0	52
52	7,29	4,18	57	4,11	56
53	5,74	3,62	63	3,2	55
54	7,79	4,61	59	4,63	59
55	6,86	4,42	64	4,32	62
56	5,64	2,55	45	2,54	45
57	7,65	2,05	27	2,29	30
58	6,9	2,625	38	2,69	39
59	7,318	2,750	37	2,71	37
60	6,662	3,85	58	4,0	60

etwas niedriger aus als die der Elektrophorese. Da für die Elektrophorese das *Beersche* Gesetz bei der Transparenzphotometrie nicht streng erfüllt ist (11, 12, 6, 16, 13, 8), ist diese Differenz erklärlich. — Hämolytische Seren, auch solche mit leichten Hämolysegraden, sind für die TES-Äthanol-Methode wie für die Elektro-

phorese (14, 15) *ungeeignet*. So ist man mit dem TES-Äthanol-Verfahren in der Lage, schnell und exakt den Albumingehalt des Serums festzustellen und durch Subtrahieren dieses Wertes vom Gesamteiweiß des Serums den Globulinanteil und damit das Verhältnis Albumin zu Globulin zu ermitteln.

Literatur

1. PILLEMER, L. und M. C. HUTCHINSON, J. biol. Chemistry 158, 299 (1945). — 2. LAVINE, S., Arch. Biochem. Biophysics 50, 515 (1954). — 3. DELAVILLE, M., G. DELAVILLE und J. DELAVILLE, Année pharmaceut. Paris, 12, 109 (1954). — 4. SCHWERT, G. W., J. Amer. chem. Soc. 79, 139 (1957). — 5. KORNER, A. und J. R. DEBRO, Nature (London) 178, 1067 (1956). — 6. OWEN, J. A., Analyst, 81, 26 (1956). — 7. MICHAEL, S. E., IV. Intern. Biochem. Kongreß, Wien (1958). — 8. WALSCH, J. R., F. L. HUMOLLER und A. L. DUNN, J. Laborat. Clin. Med., S. Louis 46, 772 (1955). — 9. KALLEE, E., F. LOHSS und W. OPPERMAN, Z. Naturforsch.

Teil B, 12, 777 (1957). — 10. WEICHSELBAUM, T. E., Amer. J. Clin. Path. (Techn. Sect.) 10, 40 (1946). — 11. FUCHS, W. und A. FLACH, Klin. Wschr. 33, 903 (1955). — 12. OSTERHUIJS, H. K., J. Laborat. Clin. Med., S. Louis 44, 280 (1956). — 13. SCHULZ, D. M. und M. HOLDCRAFT, Amer. J. Clin. Path. 26, 215 (1956). — 14. SANDKÜHLER, S., Dtsch. med. J. 13, 266 (1962). — 15. SCHOEN, R. und H. SÜDHOF, Biochemische Befunde in der Differentialdiagnose innerer Krankheiten. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1962). — 16. HINSBERG, K. und K. LANG, Medizinische Chemie. 3. Auflage S. 996, Urban & Schwarzenberg, München, Berlin (1957).

Dr. med. Z. F. Ch. Kachani
23 Kiel
Brunswiker Str. 2—6

Sauerstoff-Aufnahme von Humanplasma nach Zugabe von Kobalt

Von

J. DITTMANN und P. SACHTLEBEN

*Aus der Universitäts-Kinderklinik Homburg, Saar, und der Landesklinik Neunkirchen-Kohlhof, Saar
(Direktor: Prof. J. B. Mayer)*

(Der Schriftleitung zugegangen am 7. Februar 1964)

Gibt man 6 μMol CoSO_4 gelöst in 0,2 ml/ Wasser unter O_2 bei 38° zu 0,6 ml/ Plasma, so wird die O_2 -Aufnahme des Plasmas stark stimuliert. Gibt man die gleiche Menge CoSO_4 zu der entsprechenden Menge, nämlich 1 ml/ Blut, so bleibt der beschriebene Effekt aus.

The addition of 6 μmol . of CoSO_4 in 0.2 ml. of water to 0.6 ml. of plasma under O_2 at 38° causes a marked stimulation of the O_2 -uptake of the plasma. If the same amount is added to a corresponding amount of blood (1 ml.), there is no effect.

Wir haben die Sauerstoff-Aufnahme von Blutzellen in Gegenwart verschiedener Kobalt-II-Ionen-Konzentrationen manometrisch gemessen und dabei folgende Beobachtung gemacht: Gibt man 6 μMol Co^{2+} gelöst in 0,2 ml/ Wasser zu 1 ml/ Blut, so wird die folgende O_2 -Aufnahme gegenüber den Kontrollen ohne Co^{2+} -Zusatz etwas erhöht; gibt man die Lösung von 6 μMol Co^{2+} in 0,2 ml/ Wasser jedoch zu der entsprechenden Menge, nämlich 0,6 ml/ Plasma, so setzt nach einer gewissen Inkubationszeit eine sehr kräftige O_2 -Aufnahme ein.

Methode

Blut wurde aus der Armvene in eine mit Heparin benetzte Spritze gezogen und anschließend sofort in vorbereitete Kegelgefäße von etwa 15 ml/ Inhalt pipettiert. Für die Versuche mit Plasma wurden das Blut unmittelbar nach der Entnahme 10 Min. lang bei etwa

3000 g zentrifugiert. Genau 30 Min. nach Blutentnahme wurden die Gefäße in den Thermostaten gehängt und anschließend 5 Min. ohne Schütteln bei 38° mit reinem O_2 durchströmt. 50 Min. nach Entnahme wurde die Schüttelung der Gefäße begonnen: *Warburg*-Apparat Typ S 85 der Fa. Braun, 100 Schüttelungen pro Min., Amplitude 2 cm. Genau 60 Min. nach Blutentnahme erfolgte die erste Manometer-Ablesung, genau 90 Min. nach Blutentnahme wurde aus dem Seitenanhang Co^{2+} zugegeben. In der graphischen Darstellung gilt der Augenblick des Zukippens als Versuchsbeginn.

Inhalt der Gefäße: Trog aller Gefäße 0,1 ml/ 1 n KOH. Tabellenwerte in ml/

	I	II	III	IV
Hauptraum:	1 Blut	1 Blut	0,6 Plasma	0,6 Plasma
Anhang:	0,2 H_2O	0,2 H_2O mit 6 μMol CoSO_4	0,2 H_2O	0,2 H_2O mit 6 μMol CoSO_4